

Universidad de Cuenca



Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

*“Viabilidad y morfología de ovocitos bovinos de ovarios de
matadero de acuerdo al diámetro folicular”*

Tesis previa a la
obtención del Título
de: Médico Veterinario
Zootecnista

Autores:

Carlos Adrián Estrella Bermeo C.I 0104802053

Ana Gabriela Suconota Pizarro C.I 0105541361

Director:

Luis Eduardo Ayala Guanga, PhD C.I 0102635463

Cuenca – Ecuador

2018

RESUMEN

El objetivo fue evaluar la viabilidad y morfología de ovocitos bovinos provenientes de folículos de diferentes tamaños. Los folículos fueron medidos y clasificados en grupo 1 (<4 mm), grupo 2 (4-8 mm) y grupo 3 (>8 mm), estos se aspiraron con aguja 21G conectada a una bomba de vacío (presión 65 mmHg). Según las células del cúmulo y del citoplasma los COC's fueron clasificados en aptos y no aptos para PIV. Se aplicó la prueba del BCB para determinar la actividad de la enzima G6PD. La maduración en microgotas con un medio a base TCM199 en una incubadora a 38,5°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad, durante 24 horas. La valoración de la progresión meiótica a metafase II fue determinada con la tinción Hoesch (33342Sigma), visualizada al microscopio invertido fluorescente. Se midió el diámetro de los ovocitos antes y después de la maduración. El G2 presentó un mayor porcentaje de COC's aptos (65,7%), seguido de G3 (54,9%) y G1 (42,4%) ($P<0,05$). Se determinó que un 59,0% de COC's de G2; 44,6% de G1 y 35,7% de G3 clasificados como aptos fueron BCB+ ($P<0,05$) sin embargo el G2 presentó más BCB+ que BCB- ($P<0,05$). Finalmente, los ovocitos clasificados como aptos de G1 y G2 llegaron a metafase II en un 75% a diferencia de G3 (61%), ($P<0,05$). Asimismo, tras la maduración, los tres grupos los ovocitos disminuyeron su diámetro. Se concluye que los COC's provenientes de folículos entre 4 y 8 mm proporcionan mayor porcentaje de ovocitos que culminaron el crecimiento y alcanzaron la maduración.

Palabras Calve: Ovocitos, Bovino, Metafase.



ABSTRACT

The objective was to evaluate the viability and morphology of bovine oocytes from follicles of different sizes. The follicles were measured and classified in group 1(<4 mm), group 2(4-8 mm) and group 3(>8 mm), these were aspirated with a 21G needle connected to a vacuum pump (pressure 65 mmHg). According to the cells of the system and the cytoplasm, the COCs were classified as suitable and not suitable for PIV. The BCB test was applied to determine the activity of the G6PD enzyme. The maturation in micro drops with a TCM199 base medium in an incubator at 38.5 °C, 5% CO₂ and 90% humidity, for 24 hours. The assessment of meiotic progression to metaphase II was determined with the Hoesch stain (33342Sigma), visualized using a fluorescent inverted microscope. The diameter of the oocytes was measured before and after maturation. G2 presented a higher percentage of COC subjects (65.7%), followed by G3 (54.9%) and G1 (42.4%) ($P < 0.05$). It was determined that 59.0% of COCs of G2; 44.6% of G1 and 35.7% of G3 were found as BCB + ($P < 0.05$), however G2 presented more BCB + than BCB- ($P < 0.05$). Finally, the oocytes, as fit for G1 and G2, reached metaphase II in 75%, unlike G3 (61%), ($P < 0.05$). Also, after maturation, the three groups, the oocytes, decreased their diameter. It is concluded that the COC's from follicles between 4 and 8 mm have a higher percentage of oocytes that culminated the growth and reached maturity.

Keys words: Oocytes, Bovine, Metaphase



ÍNDICE DE CONTENIDO

1	Introducción.....	14
1.1	Objetivos	16
1.1.1	Objetivo general.....	16
1.1.2	Objetivos específicos.....	16
1.2	Hipótesis	16
2	Revisión de literatura.....	17
2.1	Fisiología reproductiva de la vaca.....	17
2.2	Ovogénesis	17
2.3	Folículoogénesis	17
2.4	Onda folicular del bovino.....	18
2.5	Producción de embriones.....	19
2.6	Técnica de recolección ovocitaria	21
2.6.1	Técnica De Slicing.....	21
2.6.2	Técnica de Aspiración	21
2.7	Selección de los ovocitos	22
2.7.1	Aspecto del citoplasma.....	22
2.7.2	Características del cúmulo que les rodea.....	22
2.7.3	Diámetro del ovocito	22
2.8	Importancia de las células del cumulo.....	22
2.9	Clasificación de ovocitos bovinos.....	23
2.10	Maduración Ovocitos	23
2.11	Fecundación <i>in vitro</i> (FIV).....	24
2.12	Cultivo de embriones	24



2.13	Prueba de azul brillante de cresilo	25
2.14	Prueba de Hoechst (fluorocromos)	25
3	Materiales y métodos	27
3.1	Materiales.....	27
3.1.1	Físicos de toma de muestras en el matadero	27
3.1.2	Biológicos	27
3.1.3	Materiales de laboratorio	27
3.2	Métodos	29
3.2.1	Área de estudio.....	29
3.2.2	Metodología para la investigación experimental	29
3.2.3	Diseño experimental	33
4	Resultados y Discusiones	34
4.1	Prueba de azul brillante de Cresilo	36
4.2	Maduración de ovocitos	37
4.3	Morfometría pre y post maduración de ovocitos clasificados como aptos 39	
4.4	Diámetros de ovocitos no aptos pre y pos maduración.....	41
5	Conclusiones.....	43
6	Bibliografía	44
7	Anexos	54



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Criterios para clasificar ovocitos bovinos según Hawk & Wall; 1994.....	23
Tabla 2: Criterio de valoración de los COCs según Hawk & Wall, (1994)	31
Tabla 3: Número de folículos aspirados, COC's recuperados y su porcentaje de recuperación en los tres grupos en estudio.....	35
Tabla 4: Número y porcentaje de COC's aptos y no aptos obtenidos en los tres grupos en estudio	36
Tabla 5: Respuesta a la prueba del azul brillante de Cresilo de COC's clasificados como aptos y no aptos pertenecientes a los tres grupos en estudio, expresados en número y porcentaje.....	37
Tabla 6 : Media, error estándar y porcentaje de ovocitos aptos y no aptos que llegaron a completar la fase de maduración (metafase II) en los tres grupos en estudio.....	39
Tabla 7: Media y error estándar del diámetro de los ovocitos clasificados como aptos y no aptos, pre y post maduración en los tres grupos en estudio, valorando el citoplasma.	41

ÍNDICE DE GRÁFICO

Gráfico 1: Ubicación del laboratorio de biotecnologías reproductivas de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Cuenca	29
---	----



Abreviatura y simbología

BCB: Azul brillante de Cresilo
COC's: Complejo cúmulo ovocitos
CL: Cuerpo Lúteo
E2: Estradiol
FIV: Fertilización in vitro de embriones
FSH: Hormona Folículo estimulante
G6PD: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
LH: Hormona Luteinizante
mm: Milímetros
µm: Microlitro
OPU: Ovum Pick Up
P4: Progesterona
PIV: Producción in vitro de embriones
MIV: Maduración in vitro de embriones
ADN: Ácido desoxirribonucleico
MI: Metafase 1
MII: Metafase 2
CG: gránulos corticales
msnm: metros sobre el nivel del mar
PBS: tampón fosfato salino
H-SOF: Hepes-Fluido Oviductual Sintético
BSA: Albúmina sérica bovina
CO₂: dióxido de carbono
GV: vesícula germinal
FD: Folículo dominante
GVBD: rotura de la vesícula germinal
An: Anafase
Tel: Telofase
p/v: peso por volumen
ARN: Ácido ribonucleico



CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN

Carlos Adrián Estrella Bermeo en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Viabilidad y morfología de ovocitos bovinos de ovarios de matadero de acuerdo al diámetro folicular", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 3 de abril del 2018

Carlos Adrián Estrella Bermeo
C.I: 010480205-3



CLAÚSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Carlos Adrián Estrella Bermeo, autor de la tesis "Viabilidad y morfología de ovocitos bovinos de ovarios de matadero de acuerdo al diámetro folicular", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 3 de abril del 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'CAR', written over a horizontal line.

Carlos Adrián Estrella Bermeo
CI: 010480205-3

CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN

Ana Gabriela Suconota Pizarro en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Viabilidad y morfología de ovocitos bovinos de ovarios de matadero de acuerdo al diámetro folicular", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 3 de Abril de 2018



Ana Gabriela Suconota Pizarro

C.I: 010554136-1



CLAÚSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Ana Gabriela Suconota Pizarro, autora de la tesis **“Viabilidad y morfología de ovocitos bovinos de ovarios de matadero de acuerdo al diámetro folicular”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 3 de Abril del 2018

Ana Gabriela Suconota Pizarro

C.I: 010554136-1

Agradecimiento

Esta investigación culmine a nuestros estudios universitarios se ha logrado realizar gracias al apoyo de nuestro director de tesis Dr. Luis Ayala Guanga PhD que con su paciencia y dedicación nos ha guiado en el proceso de este proyecto, también nuestra gratitud hacia el Dr. Daniel Argudo por la acogida en el laboratorio de biotecnología reproductiva Animal de la Universidad de Cuenca, así como a nuestros maestros que han aportado en motivado para durante nuestros estudios.

Además, queremos agradecer al Dr. Darío Sari y al personal que labora en el Camal Municipal de Cuenca (EMURPLAG) por su colaboración para la obtención de los ovarios, no podemos olvidar la ayuda brindada por nuestras familias y amigos que han sido soporte fundamental en este arduo recorrido.

“Se busca hombres para viaje peligroso. Sueldo Escaso, frío extremo, largos meses de completa oscuridad, peligro constante. No se asegura el regreso. Honor y reconocimiento en caso de éxito. Ernest Shackleton”



Dedicatoria

Esta tesis va dedicada a todas aquellas personas que han brindado ilusión en este estudio pudiendo desarrollar con gran esfuerzo, y amor.

A mis padres Ángel Estrella y Rebeca Bermeo que con sus pasos a marcado mi camino a seguir en esta trayectoria, mis hermanos Miguel Ángel y Angélica María que siempre me han brindado su confianza, mi amiga y compañera de investigación Ana Gabriela Suconota Pizarro por la paciencia y comprensión. Al Dr. Luis Eduardo Ayala Guanga por la pasión con la que nos ha guiado, y todos los amigos.

Carlos Adrián Estrella Bermeo

Quiero dedicar este trabajo de manera especial a mi padre Manuel Suconota por el apoyo, durante esta larga trayectoria, a Rosa Suconota mi hermana que siempre me ayuda en todo momento, a Marco Coronel por la confianza y el amor, de igual manera a mis hermanos y sobrinos por la alegría que me dan cada día, a Carlos Estrella por su amistad, confianza y cariño; y a todos los amigos, amigas y demás personas que forman y formaron parte de este camino.

Ana Gabriela Suconota Pizarro

1 Introducción

La producción de embriones *in vitro* (PIV) es una biotecnología muy desarrollada, que busca acoplar factores biológicos, económicos y técnicos. Con la finalidad de maximizar los recursos genéticos, mediante la producción de embriones a menor costo y la generación de nuevos aportes científicos (1) ; (2)

Los ovocitos necesarios para PIV son obtenidos de ovarios de matadero o de animales vivos (3). Lamentablemente, el porcentaje final de embriones transferibles obtenidos por esta biotecnología es bajo, debido a la calidad variable de los ovocitos (4). Varias investigaciones han determinado que este problema está relacionado con el origen de los ovarios (animales sacrificados), la etapa del ciclo estral, fase de la onda folicular, lo cual permite recuperar ovocitos en número y calidad heterogénea (2);(3). Por lo tanto, la calidad del ovocito (calidad intrínseca del ovocito primario acoplado a las condiciones de maduración usadas) determina la tasa de producción final de blastocistos (5);(6). En la actualidad apenas el 30 a 40% de los ovocitos maduros y fecundados *in vitro* alcanzan el estado de blastocisto (7), Estos parámetros contrastan con los resultados obtenidos *in vivo* donde los niveles de desarrollo de blastocistos son mayores (8).

Por otro lado, se ha establecido que el diámetro del ovocito tiene una relación directa con el tamaño del folículo, de allí que los ovocitos provenientes de folículos entre 2-8 mm son idóneos para PIV, ya que poseen características celulares necesarias para continuar su maduración *in vitro* (9). A decir de Marchal *et al.*, (10) ,esto sucede porque *in vivo*, el núcleo del ovocito se mantiene en fase de vesícula germinal (VG) favorecida por el ambiente folicular, hasta el pico preovulatorio de LH, luego de lo cual se reinicia la meiosis. Además, el ovocito tiene que completar su maduración citoplásmica y finalmente obtener la capacidad de ser fecundado y desarrollarse como un embrión viable, factores que son considerados en los protocolos de PIV. Sin embargo, otros autores describen que este proceso, denominado pre-maduración o capacitación, se produce desde el momento en que un folículo es seleccionado para convertirse



en dominante hasta poco antes del pico de LH (11). En este contexto, Hendriksen *et al.* (12), determinaron que el período de pre-maduración es pasado por alto en la PIV, cuando se utilizan ovocitos provenientes de folículos pequeños o medianos (3-8mm), ya que si bien estos ovocitos son capaces de reiniciar la meiosis existe una gran heterogeneidad en el avance de las etapas de maduración citoplásmica de los mismos.

Por lo tanto, el tamaño del folículo es un factor importante en la selección de ovocitos a utilizar en PIV (13). Pavlok *et al.*, (14) describieron que los ovocitos originarios de folículos de menos de 2 mm de diámetro no llegan a desarrollarse más allá de la etapa de 8 células, mientras que los ovocitos obtenidos de folículos con diámetros de 2-4 mm y > 4 mm poseen una competencia de desarrollo comprobada.

En busca de contribuir con información que clarifique la calidad de los ovocitos que provienen de folículos de diferente tamaño se ha planteado los siguientes objetivos.



1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Evaluar la viabilidad y morfología de los ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero de acuerdo al diámetro folicular

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar la relación entre el número de folículos aspirados y el número de ovocitos recuperados de las distintas categorías foliculares.
- ✓ Valorar la calidad morfológica, el tamaño y la reacción al azul brillante de cresilo (BCB) de los ovocitos recuperados de acuerdo la categoría folicular.
- ✓ Evaluar la tasa de maduración in vitro (nuclear y citoplasmática) de ovocitos bovinos obtenidos de folículos de diferentes tamaños.

1.2 Hipótesis

El tamaño de los folículos no influye sobre la calidad de los ovocitos bovinos recuperados de ovarios de matadero.

2 Revisión de literatura

2.1 Fisiología reproductiva de la vaca

2.2 Ovogénesis

La maduración de los ovocitos comienza antes del nacimiento cuando las células germinales primordiales han alcanzado la gónada genéticamente femenina y se diferencian en ovogonios. Estas células siguen un número de divisiones mitóticas y hacia el final del tercer mes se organizan en grupos rodeados por una capa de células epiteliales planas.

La mayoría de los ovogonios continúan dividiéndose por mitosis, pero algunos de ellos se diferencian en ovocitos primarios que después de ser formados, replican su ADN y entran en profase de la primera división meiótica. En pocos meses los ovogonios se incrementan rápidamente alcanzando un total estimado de células germinales de 7.000.000. Gran parte de los mismos al séptimo mes se vuelven atrésicos sobreviviendo solo las células que estén cercanas a la superficie, creando una reserva folicular. Los ovocitos, que van a entrar en la primera división meiótica, están rodeados por células epiteliales planas denominando como folículos primordiales (15), al mismo tiempo que se produce la detención de la meiosis en el estadio de diploteno de la profase I, conocido como estado dictiático, cuando se produce el pico preovulatorio de LH, solo el ovocito contenido en el folículo preovulatorio reinicia su meiosis hasta el estadio de metafase II y permanece así, hasta el momento de la fecundación y se transformará en óvulo (16)

2.3 Foliculogénesis

Después de la creación de la reserva folicular, un número de folículos se someten a la activación, al parecer, de acuerdo con la cronología de su formación. Este proceso dura toda la vida reproductiva (17)

Es el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular. Va desde el estadio de folículo primordial hasta el de folículo preovulatorio (18)



Una vez activado, el folículo primordial se convierte en folículo primario que presenta células de la granulosa en forma cuboidal. El ovocito parece que sólo se somete a un proceso de maduración de base, ya que su tamaño no cambia significativamente. Una modificación notable es el surgimiento de la zona pelúcida, una estructura presente entre el ovocito y las células de la granulosa a lo largo de todo el crecimiento folicular (19)

Los folículos pasan por diferentes etapas de desarrollo, las cuales han sido clasificadas según su morfología, tipo y número de células que los componen, en folículos primordiales, folículos primarios, folículos secundarios o preantrales (clase 1) y folículos antrales. Los folículos antrales son clasificados a su vez en subclases desde el 2 al 8, este último corresponde al folículo preovulatorio (20), Folículos secundarios presentan un ovocito más grande, una zona pelúcida bien desarrollada, y por lo menos dos capas de células granulosas. Durante la formación de los folículos secundarios se expresan algunos marcadores, como la activina (21), factor de crecimiento epidermal EGF (22). Al final de esta etapa, el papel desempeñado por las gonadotropinas puede ser detectado y las acciones de FSH y LH se inician. Algunos marcadores, como la activina y su proteína de unión folistatina, se han identificado como primordial en los grandes folículos antrales (23)

La siguiente etapa es el folículo terciario, que presenta varias capas de células granulosas, es el estadio en el que se inicia la formación del antro lo que representa un notable paso de crecimiento folicular. La desviación y dominancia folicular son modificaciones cruciales en este momento, aspectos importantes acerca de LH y su receptor se han descrito en esta etapa (24). La presencia de líquido folicular permite las evaluaciones ecográficas, un método esencial para los estudios in vivo, hasta el destino final del folículo: atrésia o la ovulación (25).

2.4 Onda folicular del bovino

El ciclo estral bovino se caracteriza por una serie de dos o tres ondas foliculares. Cada onda folicular es precedida por un aumento de la concentración sérica de FSH (26), lo que inicia el crecimiento de un grupo de folículos dependientes de

FSH de diámetro de 3 mm o más. La primera onda folicular se considera que comienza en el Día 1 del ciclo, en el que Día 0 se define como el día de estro. Los primeros folículos detectados continúan creciendo durante los próximos 3 días; Mientras que otros folículos de 3 mm se unen a la onda, lo que lleva a un total de 20-24 folículos de >4 mm de diámetro y confirmado por datos tras sacrificio. En el día 3 del ciclo, los folículos que primero emergieron alcanzan un tamaño de aproximadamente 8 mm mientras que los folículos que surgidos más tarde en la onda han alcanzado un tamaño de 4 a 6 mm. A partir de este día, el futuro folículo dominante (FD) comienza a crecer más rápido que los otros folículos, que se vuelven subordinados. En general, desde el día 6 en adelante el folículo dominante alcanza su tamaño más grande. El folículo dominante pierde su dominio entre el Día 8 y 10, dando lugar a la aparición de una nueva onda. Después de la regresión luteal, el FD de la segunda onda induce el aumento de LH que inicia la maduración final de los folículos y los ovocitos produciendo la ovulación. Por lo tanto, se pueden distinguir dos fases principales dentro de la onda folicular: la fase de crecimiento y la fase de dominancia (27). Los folículos que no llegan a la fase de ovulación eventualmente se convierten en atrésicos, mediados por un proceso de muerte celular progresiva (apoptosis), y finalmente serán eliminados.

La atresia es inducida principalmente durante la fase de dominancia y afecta a dos grupos de folículos. El primero consiste en folículos 14 mm de diámetro FSH-dependientes en la fase de crecimiento anterior, pero perdió la lucha por el dominio (28). El segundo grupo consiste en folículos que alcanzan la fase dependiente de FSH durante una fase de dominancia y carecen de apoyo para un crecimiento posterior. Existen indicios de que los folículos atrésicos tempranos pueden rescatarse mediante la administración de gonadotropinas exógenas (28);(29)

2.5 Producción de embriones

La producción de embriones bovinos *in vitro* hoy en día no solo tiene la finalidad de investigación, sino también se la utiliza para obtener embriones en otras



especies, incluida la humana, para preservar descendencia a partir de vacas de alto valor genético y aprovechamiento de hembras sacrificadas por motivos sanitarios, accidentes o reposición (30);(31)

Por primera vez, la producción mundial de embriones de FIV bovina superó la marca de medio millón con un total de 546.628 embriones producidos, 517.587 por sesión de OPU y 29.041 por recolección de ovarios de mataderos. Este es un salto significativo del 19.5% desde el máximo anterior de 457.455 en 2012 y es indicativo de la rápida popularidad de los embriones bovinos de FIV en todo el mundo.

En América del Sur, particularmente en Brasil, que produce el 70,8% de los embriones bovinos tanto en OPU como en FIV en el mundo; solo en América del Sur se ha incrementado en un (6%), Japón y Corea del Sur son los líderes en la producción de embriones en FIV derivados del matadero, produciendo 48,1% y 41,0% de la producción mundial de este tipo de embriones (32)

La técnica de FIV está basada en la maduración artificial de huevos no fecundados (oocitos) que generalmente provienen de los ovarios de vacas sacrificadas en mataderos, los que posteriormente son fecundados con espermatozoides crio-preservados previamente capacitados; los cigotos resultantes se incuban en el laboratorio hasta la etapa de blastocisto. La técnica de FIV permite obtener muchos embriones sincronizados a una etapa específica de desarrollo (33)

El primer ternero resultado de un ovocito madurado y fecundado *in vitro* nació en 1986 después que el embrión fue cultivado en el oviducto de una oveja por 5 días (34). Sin embargo, los primeros terneros nacidos de ovocitos madurados *in vitro*, fecundados y cultivados (desarrollo temprano) *in vitro* se reportó en 1987 (35). Un año más tarde en Latinoamérica, se produjo en Uruguay, el primer nacimiento de dos terneros obtenidos de FIV (36)

2.6 Técnica de recolección ovocitaria

La colecta de los ovocitos puede ser por aspiración con jeringa o bien cortando el ovario (Técnica De Slicing) (37);(38), la aspiración se debe realizar en folículos superficiales mayores de 2mm.

2.6.1 Técnica De Slicing

Este método consiste en colocar los ovarios en placas de Petri con medio de recolección de ovarios y cortar la superficie y el interior con un bisturí, haciendo cortes de 2mm de separación (38)

2.6.2 Técnica de Aspiración

La aspiración de ovocitos se realiza con una jeringa de 5 o 10 ml y aguja hipodérmica estéril 18 G, posteriormente el líquido folicular es depositado en placas de Petri para buscar los ovocitos aspirados (39). Comparando las dos técnicas de obtención de ovocitos señalan que mediante el corte del ovario se obtienen ovocitos de mejor calidad para la fecundación *in vitro*, así como un mayor número, las tasas en la disminución de recuperación y producción de embriones en el caso de la aspiración folicular puede ser debido al efecto nocivo sobre el cúmulos durante la aspiración (40)

Existe poca diferencia entre la recuperación de ovocitos post mortem vs in vivo; habiendo un mayor control y facilidad en la punción post mortem del ovario, siendo más difícil la visualización por ecografía, con la donante viva; además, hay diferencias entre puncionar un ovario con una jeringa y aguja a la aspiración in vivo con una presión de vacío de aspiración ajustable (41). Una de las principales ventajas del uso de donantes vivas es el acceso a animales de gran valor genético, recolectando ovocitos repetidamente, incluso en estado de preñez, incrementado la eficiencia productiva. En el caso de Ovum Pick Up (OPU) el animal no tiene que tener un ciclo productivo normal, se puede repetir en el mismo animal durante 5 a 6 meses, con una periodicidad de dos aspiraciones por semana o una semanal (42)

2.7 Selección de los ovocitos

La morfología del ovocito ofrece datos sobre su capacidad para iniciar la meiosis, se debe establecer criterios, exclusivamente morfológicos, para seleccionar los gametos que garanticen un buen comportamiento en su maduración (43). La selección de los ovocitos se realiza en base a tres criterios: Aspecto del citoplasma, características del cúmulo que les rodea y el diámetro del ovocito.

2.7.1 Aspecto del citoplasma

El aspecto del citoplasma del ovocito debe poseer un granulado fino y uniforme, sin mostrar espacio peri-vitelino ni vacuolizaciones (43)

2.7.2 Características del cúmulo que les rodea

Aspecto y morfología del cúmulos celular que le rodea, no debe encontrarse expandido ni disperso sino compacto y sin aglutinaciones (44). Se produce una mayor tasa de maduración *in vitro* cuando se seleccionan ovocitos que presentan las células de la corona radiada claramente diferenciadas del resto del cúmulo celular que rodea al ovocito (45)

2.7.3 Diámetro del ovocito

El diámetro de los ovocitos, está relacionado con la capacidad para madurar, es decir que la tasa de maduración nuclear aumenta con el diámetro de los ovocitos, de tal forma que los ovocitos bovinos con un diámetro inferior a 110 μm están todavía efectuando la síntesis de ARN, por lo que se encuentran todavía en fase de crecimiento y no han completado aún la capacidad para la maduración nuclear y citoplasmática al momento de FIV. Cuando los ovocitos superan los 110 μm de diámetro la mayoría de ovocitos llegan a metafase II ya que han culminado su maduración nuclear y citoplasmática (46)

2.8 Importancia de las células del cúmulo

Investigaciones han determinado que la carencia de las células del cúmulo afecta directamente en el desarrollo del ovocito, ya que existe una comunicación bilateral entre el ovocitos y las células del cúmulos (47); mediante uniones gap y factores paracrinós de señalización (48). Además se existe una reducción del

reinicio meiótico (49); se debe a que los ovocitos desnudos son incapaces de responder a la LH y FSH, ya que estas células son las mediadoras del efecto de las gonadotrofinas (50); (51). Las gonadotrofinas provocan un aumento significativo en la cantidad de AMPc en las células de la granulosa e inducen la maduración ovocitaria (49).

2.9 Clasificación de ovocitos bovinos

Tabla 1: Criterios para clasificar ovocitos bovinos según Hawk & Wall; 1994

Tipo de ovocito	Características del cúmulo	Características del ovocito
Calidad buena (A)	Compacto, con varias capas de células, con granulosa adherida ; el citoplasma se ve claramente	Homogéneo denso y finamente granulado.
Calidad intermedia (B)	Grueso, usualmente con granulosa adherida, pero el citoplasma no se ve claramente; cúmulo compacto, con pocas a varias capas, cubriendo al menos la mitad de la zona pelúcida	Rango desde homogéneo denso y finamente granulado agranulado de tamaño moderado.
Calidad baja (C)	Parcial o completamente expandido con cúmulo disperso, falta de células con presencia de material extracelular, cúmulo descolorido (café claro o muy oscuro); corona radiata sin cúmulo; ovocitos desnudos	Granulado grueso o con mezcla de áreas muy claras o muy oscuras; citoplasma descolorido (café claro u oscuro); ovocitos deformes.

Fuente (52)

2.10 Maduración Ovocitos

La maduración de ovocitos es un proceso complejo que comprende maduración nuclear (reanudación de la meiosis y progresión de la vesícula germinal (GVBD) a la metafase II (53), y maduración citoplasmática (migración de organelas como gránulos corticales (CG), mitocondrias y cambios bioquímicos en el citoplasma) (54)

Los ovocitos para ser fértiles tienen que pasar por un proceso, de desarrollo y diferenciación (55) para que alcancen la metafase II. La maduración depende de la interacción de varios factores (56), como la temperatura, osmolaridad, pH y concentración de hormonas siendo esta última el factor más importante (57)

2.11 Fecundación *in vitro* (FIV)

La fertilización es el término de una serie de eventos previos que involucran complejos mecanismos de reconocimiento celular e interacción gamética (58), los espermatozoides deben ser previamente capacitados la cual se realiza retirando las glicoproteínas de la membrana del espermatozoide adquiriendo su capacidad para poder fecundar al ovocito.

Durante la capacitación ocurren varios fenómenos:

- Los espermatozoides adquieren hipermotilidad progresiva
- Adquieren capacidad de penetrar el cúmulo oóphorus
- Se preparan para que tenga lugar la reacción acrosómica (36)

El ovocito maduro, permanece en metafase II hasta su fertilización, al ser fecundado, completa la Meiosis II y extrude el 2º corpúsculo polar. La cabeza del espermatozoide forma el pronúcleo masculino y el núcleo del óvulo el pronúcleo femenino, los cuales se fusionan para completar el número diploide. Para realizar FIV los COC's maduros se lavan y se colocan en gotas de inseminación junto con el medio de fecundación el cual contiene los espermatozoides (59)

2.12 Cultivo de embriones

Los embriones resultantes de FIV son cambiados del medio de fecundación a un medio de cultivo, continúan su división celular (8, 16 y 32 células) hasta llegar a mórulas y blastocistos. Al llegar a estos estadios, los embriones pueden ser transferidos a vacas receptoras (en fresco) o sometidos al proceso de vitrificación para su posterior uso. Durante esta etapa destacan la presencia en el medio de cultivo de diversas fuentes de energía como la glucosa y aminoácidos esenciales y no esenciales (60). Los medios simples más utilizados para el cultivo de los embriones bovinos son: fluido oviductal sintético, con base a los componentes

encontrados en el fluido oviductal ovino, y Potassium Simplex Optimized Medium KSOM (61), proporcionando el constante interés por encontrar componentes para la vigorosa nutrición de los embriones (62)

2.13 Prueba de azul brillante de cresilo

El azul brillante de cresilo (BCB) es un pigmento usado como tinción vital que permite clasificar células en base a la retención o reducción de este colorante en el citoplasma. La condición de ser retenedor o no del pigmento depende de la actividad de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la cual reduce el cresilo volviéndolo un compuesto incoloro. En particular, esta enzima cataliza la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato, que es la reacción limitante de esta, es decir, la funcionalidad de la vía depende de la actividad de esta enzima. En los ovocitos la vía de las pentosas fosfato está activa cuando hay procesos de biosíntesis y crecimiento celular, deprimiendo su actividad cuando el ovocito termina su fase del crecimiento (63). Así, los ovocitos que mantienen el citoplasma azul tras ser cultivados con BCB son aquellos que terminaron su fase de crecimiento y están aptos para seguir la maduración.

Pujol *et al* ., (64) ; (5) Aparecieron, a aquellos ovocitos seleccionados como positivos a la prueba tienen mayores diámetros y mejor calidad morfológica que su contraparte negativa a la prueba. Samaniego menciona que el 100% de ovocitos de calidad A reaccionaron positivos al BCB (65) Además, se ha determinado que los ovocitos con mayor afinidad por el BCB, previo a la maduración, presentan una mayor capacidad de progresión meiótica, una mayor expresión del factor promotor de la maduración y mayor actividad mitocondrial (63);(66). También hay reportes de un aumento en la tasa de desarrollo de blastocistos en cabras pre-púberes (66) vaquillas (64) y vacas (67).

2.14 Prueba de Hoechst (fluorocromos)

El ovocito con citoplasma homogéneo y con el primer corpúsculo polar extruido indica que se encuentra en metafase II. La extrusión del corpúsculo polar en el bovino se da a las 16 horas iniciada la maduración *in vitro* y alcanza el nivel más



alto a las 22-24 horas (68), como no es visible se necesita de un medio de tinción con fluorocromos este es específico para ADN como Hoechst 33342 (69)

3 Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Físicos de toma de muestras en el matadero

- ❖ Vehículo
- ❖ Overol
- ❖ Botas
- ❖ Casco
- ❖ Mandil
- ❖ Termo de transporte
- ❖ Guantes Nitrilo
- ❖ Toallas desechables
- ❖ Jabón
- ❖ Agujas Desechables 21 G
- ❖ Bomba de Aspiración
- ❖ Sistema de Guía de Aguja con aguja larga desechable 20 G
- ❖ Set de mangueras
- ❖ Cámara fotográfica

3.1.2 Biológicos

- ❖ Ovarios de bovinos

3.1.3 Materiales de laboratorio

- ❖ Pipetas automáticas
- ❖ Placa Petri (95 mm, 25 mm)
- ❖ Estéreo microscopio
- ❖ Filtros
- ❖ Vaso de precipitación
- ❖ Baño maría
- ❖ Platina de calefacción
- ❖ Cajas de cultivo NUNC con pocillos (4 o 5)
- ❖ Tubos Falcón 15 mL



- ❖ Tubos Falcón 50 mL
- ❖ Puntas de pipetas (tips) amarillos (sin corona)
- ❖ Tubos Ependorf de 1.5 mL
- ❖ Cámara de maduración
- ❖ Microscopio de fluorescencia
- ❖ Materiales de oficina
- ❖ Computadora
- ❖ Programas informáticos
- ❖ Sitios de navegación
- ❖ Libros acordes a la temática
- ❖ Impresora
- ❖ Cuaderno de campo
- ❖ Esferos
- ❖ Medios de almacenamiento (Memory)
- ❖ Calculadora
- ❖ Marcadores

3.2 Métodos

3.2.1 Área de estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, ubicado en la granja Irquis, en parroquia Victoria del Portete, a 22 km de la ciudad de Cuenca, entre las coordenadas geográficas latitud 3° 4'48.34"S y longitud 79° 4'30.12"O, a una altura de 2650 msnm. La precipitación anual es aproximadamente de 2500 mm anuales y temperatura oscila entre 3 a 18°C.



Gráfico 1: Ubicación del laboratorio de biotecnologías reproductivas de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Cuenca (70)

3.2.2 Metodología para la investigación experimental

3.2.2.1 Recolección de ovarios para el estudio

Los ovarios fueron recolectados en el Camal Municipal de Cuenca (EMURPLAG EP) dos veces por semana, y se transportaron en solución salina más antibiótico a una temperatura entre 35 - 37°C, hasta el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal ubicado en la granja Irquis, en un tiempo no mayor a tres horas. En el laboratorio, los tejidos adyacentes a los ovarios (cuernos uterinos, ligamento, segmentos de oviducto, etc.) se removieron con una tijera quirúrgica.

Inmediatamente, los ovarios se lavaron con cloruro de sodio al 0,9% estéril, dos o tres veces, hasta que el contenido líquido estuviera completamente cristalino.

3.2.2.2 Aspiración folicular

Después del lavado, los folículos a puncionar fueron medidos y categorizados en tres grupos: **1:** < 4 mm; **2:** 4-8 mm y **3:** >8 mm. Una vez clasificados los folículos, se puncionaron los del grupo 1 con una aguja de calibre 21G conectada a una bomba de vacío (WTA BV 003D ®) con una presión de 65 mmHg. El líquido aspirado fue depositado en un tubo Falcón de 50 ml atemperado a 35 - 37 °C con un medio de colección a base de PBS. El mismo procedimiento se repitió para los grupos 2 y 3, colocando cada categoría en tubos Falcón diferentes. Una vez depositados los COC's en el tubo Falcón se esperó 15 minutos para que decantaran en el fondo cónico, para luego colectar el pellet con una pipeta Pasteur. Se colocó esta fracción en una placa de búsqueda de 95 mm², se extendió en un área aproximada de 3 a 4 cm². Inmediatamente, se trasladó la placa a un estereoscopio para buscar y seleccionar los complejos cúmulos ovocitos (COC's) de los tres grupos, por separado.

Los COC's obtenidos del grupo 1 fueron clasificados en categorías A, B y C de acuerdo al criterio descrito por Hawk & Wall (1994), pero para mayor facilidad de trabajo se juntaron los de categorías A y B y se denominaron aptos, por tener mayor competencia para madurar, ser fecundados y continuar el desarrollo embrionario, y a los C se les denominó no aptos (52). Estos COCs se sometieron a un proceso de lavado en medio H-SOF (Hepes-Fluido Oviductal Sintético) (3 lavados sucesivos en gotas de 100 ul) con el fin de librarlos de detritos tisulares, coágulos, etc. Posteriormente los COC's se depositaron en micro gotas de 100 ul de H-SOF de acuerdo a la categoría que correspondiera (aptos y no aptos); la maniobra fue repetida con los COCs de los grupos 2 y 3.

Tabla 2: Criterio de valoración de los COC's según Hawk & Wall, (1994)

Tipo de ovocito	Características del cúmulo	Características del ovocito
Calidad buena (A)	Compacto, con varias capas de células, con granulosa adherida ; el citoplasma se ve claramente	Homogéneo denso y finamente granuloso.
Calidad intermedia (B)	Grueso, usualmente con granulosa adherida, pero el citoplasma no se ve claramente; cúmulo compacto, con pocas a varias capas, cubriendo al menos la mitad de la zona pelúcida	Rango desde homogéneo denso y finamente granuloso o agranuloso de tamaño moderado.
Rechazados (C)	Parcial o completamente expandido con cúmulo disperso, falta de células con presencia de material extracelular, cúmulo descolorido (café claro o muy oscuro); corona radiata sin cúmulo; ovocitos desnudos	Granuloso grueso o con mezcla de áreas muy claras o muy oscuras; citoplasma descolorido (café claro u oscuro); ovocitos deformes.

Fuente: (52)

Una vez finalizado la clasificación se contaron los COCs por categoría y grupo que se obtuvo, es decir, grupo 1 (categorías aptos y no aptos); grupo 2 (categoría aptos y no aptos); grupo 3 (categoría aptos y no aptos).

3.2.2.3 Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)

De las diferentes categorías (aptos y no aptos) de cada grupo (1, 2 y 3), se tomaron al azar un 50 % de los COC's, por separado, y fueron expuestos a un medio compuesto por Hialuronidasa (Sigma) en concentración 1mg/ml (p/v) por dos minutos. Luego se procedió a denudar las células del cúmulo por acción mecánica ejercida al pipetear varias veces el fluido con los ovocitos. El estado de desarrollo y el crecimiento de los ovocitos se valoraron por la actividad de la enzima glucosa 6 fosfatos deshidrogenasa (G6PD) a través de la tinción vital azul brillante de cresilo. Para ello los ovocitos se colocaron por separado en una

gota de 50 μ l con BCB al 26 μ m en Dulbecco's PBS por separado, luego fueron colocados en una incubadora por 90 minutos a 38.5°C, 5% de CO₂ y humedad de saturación. Cumplido el tiempo los COCs se evaluaron en una gota de medio H-SOF. Los ovocitos que no tiñeron su citoplasma se consideraron negativos, y los teñidos positivos, de acuerdo a la metodología indicada por Catalá *et al.* (63)

3.2.2.4 Determinación de la morfometría de los ovocitos inmaduros

Los ovocitos que fueron sometidos a la tinción de BCB se utilizaron para medir su diámetro (sin zona pelúcida) con un software (AmScope V.3.7) calibrado para realizar mediciones en micras, el cual funciona con una cámara de alta definición (Excelis AU-600-HD) acoplada a un microscopio con un lente 100x.

3.2.2.5 Maduración de los COCs

El 50% de los ovocitos de cada grupo y categoría fueron puestos a madurar.

a) Medio de Maduración: TCM 199 suplementado con 10% Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 1%, 100 μ g/ml de Piruvato de Sodio, 0,75 mg/ml de L-Glutamina, 4 μ g/ml de FSH-p (Folltropin®, Bioniche, Canadá), 2 μ g/ml de estradiol y 250 μ g/ml de gentamicina.

b) Maduración. Se realizó en seis microgotas, tres gotas de medio de maduración en cada caja Petri de 25 mm. Las cajas fueron rotuladas, la primera como categoría aptos de los grupos 1, 2,3 y la segunda como categoría no aptos de los grupos 1, 2, 3 respectivamente; se colocaron los COCs en cada gota según su clasificación, y fueron rápidamente llevadas a la estufa de maduración por 18-24 horas a una temperatura de 38.5 °C, 5% de CO₂ al 5% y 90% de humedad

3.2.2.6 Evaluación de la progresión de la meiosis luego de la maduración *in vitro*

Tras ser madurados los COC's se observaron bajo una lupa estereoscópica para verificar la expansión del cúmulo y el grado de mucosidad. Para determinar el estado de maduración nuclear (progresión de la meiosis) los ovocitos se desnudaron con el procedimiento antes mencionado; fueron expuestos por 10 minutos al fluorocromo Hoechst (33342, Sigma) en concentración de 1 μ g/ml

(p/v), seguidamente se evaluó en un microscopio invertido con un sistema luz de fluorescencia. Se comprobó si los ovocitos estaban en estado de vesícula germinal (GV), rotura de la vesícula germinal (GVBD), metafase I (MI), anafase-telofase I (An-Tel I) y metafase II (MII; primer corpúsculo polar), degenerado (Dg).

3.2.3 Diseño experimental

La investigación fue experimental con tres tratamientos y 14 repeticiones (sesiones de aspiración), donde se valoraron tres tamaños de folículos diferentes: grupo 1 (<4 mm); grupo 2 (4-8 mm) y grupo 3 (>8 mm).

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS® versión 24. Se determinaron estadígrafos principales. Para comparar frecuencias se aplicó la prueba de Chi cuadrado al 5% en las variables porcentajes de: recuperación de ovocito; COC's aptos y no aptos, ovocitos BCB+ y BCB-; maduros e inmaduros. Para las variables cuantitativas se utilizó la prueba de ANOVA y para comparar las medias la prueba de Tukey al 5%. Las variables promedio de ovocitos recuperados; número de COC's aptos y no aptos; ovocitos BCB+ y BCB- y promedio de ovocitos maduros e inmaduros; así como, el diámetro de los ovocitos.

4 Resultados y Discusiones

Se realizaron 14 sesiones de aspiración de ovocitos de un total de 648 ovarios, en promedio se obtuvieron 5,21 folículos/ovario, aspirando en total 3.373 folículos. Antes de la aspiración los folículos fueron medidos y clasificados en 3 grupos de acuerdo al diámetro en: G1 <4 mm (n=1.964 folículos); G2 4-8 mm (n=1.073 folículos); G3 >8 mm (n=336 folículos).

En el grupo 2 (folículos de 4-8 mm) se recuperó un 76,1% de COC's valor que difirió ($P<0,05$) de los grupos 1 y 3 donde la recuperación fue del 64,7 y 63,4% respectivamente (**tabla 3**). Los porcentajes de recuperación de COC's son similares a los establecidos por Perea *et al.*, (71), quienes describieron valores que oscilan entre 56,5 y 64,6%, al utilizar presiones de vacío de 50, 65 y 80 mmHg. Pavlok *et al.*, (14), obtuvieron un porcentaje de recuperación de COC's del 90%, pero mencionaron que apenas el 40% de estos COC's se encontraban aptos para FIV, seguramente por la presión que utilizaron para la recuperación de los COC's. Samaniego *et al.*, (5) en su trabajo establecieron un porcentaje de recuperación global del 68,9%, al realizar OPU con una presión de 65 mmHg, valor que es similar al obtenido por Perea *et al.*, (71) y el de este trabajo.

En la presente investigación en el grupo 2 (4-8 mm) se recuperó más del 76% de COC's. Más aún, las tasas de embriones logrados con las herramientas *in vitro*, aún continúan siendo bajas. La obtención *in vitro* de embriones generalmente se ha logrado a partir de folículos que van desde 1-8 mm en diámetro (72). Adicionalmente, investigadores reportan que los ovocitos adquieren la competencia meiótica cuando alcanzan diámetros superiores a 110 μ m, correspondiente a diámetros foliculares entre 2-3mm (73).

Tabla 3 : Número de folículos aspirados, COC's recuperados y su porcentaje de recuperación en los tres grupos en estudio

	G1 (<4mm)	G2 (4-8mm)	G3 (>8mm)
Folículos aspirados	1964	1073	336
COC's recuperados	1270	817	213
% de recuperación	64,7 ^a	76,1 ^b	63,4 ^a

Valores con letras diferentes en la misma línea difieren ^{a,b} P<0,05

Los COC's recuperados en cada uno de los grupos fueron clasificados en aptos (tipos A y B) y no aptos (tipo C), según la valoración descrita por Hawk & Wall (52) y modificada por Samaniego *et al.*, (5) **Tabla 4.**

Se determinó que el grupo 2 (4-8 mm) presentó un mayor porcentaje de COC's valorados como aptos (65,7%), seguido del grupo 3 (54,9%) y el grupo 1 (42,4%), con diferencia estadística entre los grupos ($P<0,05$). En cuanto a los COC's clasificados como no aptos el grupo 1 presentó el mayor porcentaje seguido del grupo 3 y 2 (**Tabla 4**). Pavlok *et al.*, (14), obtuvieron ovocitos intactos (tipo A) en un 40,1%; 32,7% y 34,7% para los provenientes de folículos grandes, medianos y pequeños, valores que están muy por debajo de los obtenidos en la presente investigación seguramente por las diferentes presiones que utilizaron. En otros trabajos se describen porcentajes superiores al 80% de ovocitos recuperados de tipo A y B, es decir los que son considerados en este estudio como aptos (71). Al recuperar ovocitos con la técnica de OPU Samaniego *et al.*, (5), describieron una recuperación de COC's de tipo A y B del 61,1% en vaquillas estimuladas hormonalmente y un 36,9% en los animales no estimulados. Segura *et al.* (74), obtuvieron más ovocitos de calidad A en los folículos pequeños y medianos (1-2 mm; 3-4 mm) que en los grandes (5-6 mm). Independientemente del porcentaje de recuperación de ovocitos de calidad A y B, los autores antes citados coinciden en que los folículos entre 2-6 mm proporcionan mayor cantidad de COC's aptos para la PIV, lo cual está en concordancia con lo obtenido en la presente investigación.

Al valorar el porcentaje de COC's aptos y no aptos dentro de un mismo grupo, se estableció que en el grupo 2 se recuperaron casi el doble de COC's aptos en

relación con los no aptos ($P<0,05$). En contraposición en el grupo 1 fue mayor el porcentaje de COC's no aptos ($P<0,05$), mientras que en el grupo 3 se recuperaron porcentajes similares de las dos categorías ($P>0,05$). Estos resultados concuerdan con lo señalado por Lonergan *et al.*, (75), quienes determinan que los ovocitos con mayor cantidad de células del cúmulo (tipo A) proceden de folículos > 6 mm.

Tabla 4: Tabla 4. Número y porcentaje de COC's aptos y no aptos obtenidos en los tres grupos de folículos en estudio

Tipos de COC's	Categoría de folículos		
	G1(<4 mm)	G2 (4-8 mm)	G3 (>8 mm)
Aptos (AB)	539 /42,4 ^{aA}	537 /65,7 ^{bB}	117 /54,9 ^{cA}
No aptos (C)	731 /57,6 ^{aB}	280 /34,3 ^{bA}	96 /45,1 ^{cA}

Valores con letras minúsculas diferentes en la misma línea difieren ^{a,b,c} $P<0,05$. Valores con letras mayúsculas diferentes en la misma columna difieren ^{A,B} $P<0,05$

4.1 Prueba de azul brillante de Cresilo

La prueba del azul brillante de Cresilo puede ser usada para mejorar la selección de los ovocitos para la PIV. (76) Investigadores como Catalá *et al.*, (63), describieron que la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa está ausente cuando la biosíntesis y crecimiento celular ha concluido, por lo cual los ovocitos reaccionan positivamente a la prueba (BCB+).

La prueba del azul brillante de Cresilo determinó que un 59,0% (grupo 2), 44,6% (grupo 1) y 35,7% (grupo 3) de los COC's clasificados como aptos fueron BCB+, es decir, habían terminado su crecimiento y estaban listos para continuar con el proceso de maduración (**Tabla 5**), sin presentar diferencia estadística ($P>0,05$) entre los grupos. Sin embargo, al valorar el porcentaje de COC's clasificados como aptos que reaccionaron BCB+ y BCB- dentro de un mismo grupo, se estableció que en el grupo 2 se obtuvieron más BCB+ que BCB- ($P<0,05$).

Los resultados de la presente investigación son similares a los obtenidos por Karami *et al.*, (76) quienes describen que los COC's recuperados de los folículos medianos (3-6 mm) presentaron mayores porcentajes de ovocitos BCB+ ($64,56\pm5,46\%$); sin embargo, los otros dos grupos, los pequeños (<3 mm) y

grandes (>6 mm), poseían ovocitos BCB+ en un rango entre 45 y 59%. Igual tendencia encontró Mirshamsi *et al.*, (77) quienes determinaron que los ovocitos BCB+ eran más numerosos que los BCB- ($54,3 \pm 4,8\%$ vs $45,6 \pm 5,0\%$).

Los COC's clasificados como no aptos en los tres grupos en estudio reaccionaron positivamente a la prueba del BCB entre un 40,2 y 50,4% (**Tabla 5**). Samaniego *et al.*, (5) mencionaron que entre un 56,3 a 68,4% de los COC's clasificados como no aptos fueron BCB+.

Tabla 5: Respuesta a la prueba del azul brillante de Cresilo de COC's clasificados como aptos y no aptos en los tres grupos foliculares en estudio (número y porcentaje).

Tipos de COC's	Actividad BCB	Categoría de folículos		
		G1 (<4mm)	G2(4-8mm)	G3(>8mm)
Aptos (AB)	BCB+	112 /44,6 ^{aA}	138 /59,0 ^{aB}	20 /35,7 ^{aA}
	BCB-	139 /55,4 ^{aB}	96 /41,0 ^{aA}	36 /64,3 ^{aB}
No Aptos (C)	BCB+	143 /40,2 ^{aA}	65 /50,4 ^{aA}	18 /40,9 ^{aA}
	BCB-	213 /59,8 ^{aA}	64 /49,6 ^{aA}	26 /59,1 ^{aA}

Valores con letras minúsculas diferentes en la misma línea difieren ^{a,b,c} $P < 0,05$. Valores con letras mayúsculas diferentes en la misma columna dentro de cada tipo de COC difieren ^{A,B} $P < 0,05$

4.2 Maduración de ovocitos

Los folículos entre 1-6 mm proporcionan ovocitos que se usan para la maduración *in vitro*, ya que tienen la capacidad para reanudar la meiosis (78). Esta reanudación puede ser inducida al colocar un ovocito en un medio adecuado de maduración *in vitro* (79). Si bien este fenómeno ha sido ampliamente explotado para producir embriones bovinos *in vitro* de ovarios de matadero, es evidente que los ovocitos de tales ovarios proveen material hereditario desconocido que pudiera portar genes indeseables para la producción animal (80).

En la presente investigación se determinó que los ovocitos clasificados como aptos del grupo 1 (<4 mm) y 2 (4-8 mm), presentaron una reanudación meiótica y llegaron a metafase II aproximadamente en un 75% a diferencia del grupo 3 (>8 mm) quienes llegaron a presentar un 61% de maduración ($P < 0,05$). En cuanto a los ovocitos considerados no aptos los grupos 1 y 2 llegaron en un 60%

a madurar a diferencia del grupo 3 que maduraron en un 44% ($P < 0,05$). Por lo tanto, se observó que los ovocitos provenientes de folículos < 8 mm considerados aptos llegaron a madurar en mayor porcentaje. Autores como Segura *et al.*, (74) determinan porcentajes de maduración superiores al del presente trabajo en ovocitos provenientes de folículos de 1-2 mm (89%) y 3-4 mm (85%); Sin embargo, en folículos de 5-6 mm obtuvieron apenas un 25%, se considera que la diferencia en los resultados se debe a la forma diferente de clasificación de los grupos de folículos en los dos estudios.

Sin embargo, los resultados del presente estudio corroboran lo descrito por Yang *et al.*, (72), quienes obtuvieron más embriones *in vitro* a partir de folículos que van desde 1-8 mm en diámetro; además, concuerda con la teoría de que los ovocitos adquieren la competencia meiótica cuando alcanzan diámetros superiores a $110 \mu\text{m}$, correspondiente a diámetros foliculares entre 2-3 mm (73)

Un dato interesante se observó en los ovocitos clasificados como no aptos en la presente investigación, mismos que llegaron a madurar en un alto porcentaje (60%), constituyéndose en una fuente interesante de gametas viables (**Tabla 6**).

Tabla 6 : Media, error estándar y porcentaje de ovocitos aptos y no aptos que completaron la fase de maduración (metafase II) en los tres grupos de folículos en estudio.

Tipos de COC's	Categoría de folículos		
	G1 (<4mm)	G2 (4-8mm)	G3 (>8mm)
Aptos			
<i>Maduros</i>	13,9 ± 1,41(74,9%) ^{a,A}	13,5 ± 1,78 (75,6%) ^{a,A}	2,6 ± 0,35 (61,7%) ^{b,A}
<i>Inmaduros</i>	4,6 ± 0,55 (25,1%) ^{a,B}	4,4 ± 0,87 (24,4%) ^{a,B}	1,6 ± 0,46 (38,3%) ^{b,A}
No aptos			
<i>Maduros</i>	13,7 ± 1,96 (59,6%) ^{a,A}	5,5 ± 0,93 (60,6%) ^{b,A}	1,4 ± 0,31 (44,2%) ^{b,A}
<i>Inmaduros</i>	9,3 ± 0,69 (40,4%) ^{a,A}	3,6 ± 0,53 (39,4%) ^{b,B}	1,7 ± 0,30 (55,8%) ^{b,A}

Valores con letras minúsculas diferentes en la misma línea difieren ^{a,b} P<0,05. Valores con letras mayúsculas diferentes en la misma columna dentro de cada tipo de COC difieren ^{A,B} P<0,05

Al comparar los ovocitos maduros e inmaduros (columnas) dentro de un mismo tipo de los COC's, se determinó que en G1 y G2 existían 3 veces más ovocitos maduros que inmaduros (P<0,05), no ocurriendo lo mismo, en G3 donde no hubo diferencia estadística (**Tabla 6**).

En los COC's no aptos, sin embargo, se determinó diferencia estadística únicamente en G2 (4-8 mm) donde hubo alrededor de 1,5 más ovocitos maduros que inmaduros (**Tabla 6**). Los ovocitos inmaduros provenientes de folículos de 4-8 mm de diámetro de esta categoría que llegaron a madurar posiblemente perdieron sus células del cúmulo por acción mecánica, razón por la cual probablemente fueron ser clasificados como no aptos.

4.3 Morfometría pre y post maduración de ovocitos clasificados como aptos

El diámetro promedio de los ovocitos del grupo 3 antes y después de la maduración (124,0±1,13 y 120,3±0,94 µm, respectivamente), fue superior a los del grupo 1 y 2 que mantuvieron medidas similares. Además, luego de la maduración *in vitro* (MIV) se observó una disminución mayor del diámetro

ovocitario en los del grupo G1 ($-3,4 \pm 0,62 \mu\text{m}$) y G3 ($-3,7 \pm 1,20 \mu\text{m}$), que en los de G2 ($-1,9 \pm 0,69 \mu\text{m}$), **Tabla 7**.

El diámetro que se determinó en los ovocitos antes de la maduración en este estudio es semejante al descrito por investigadores como Arlotto, *et al.*, (81), quienes reportaron diámetros de $123,5 \pm 8,1$, $124,9 \pm 9,2$ y $128,0 \pm 8,5 \mu\text{m}$ en ovocitos provenientes de folículos que median entre 3-6, 6-10 y 10-15 mm respectivamente; o como Wit & Kruip (82), con ovocitos bovinos de categoría A y B que promediaron de $122,6 \mu\text{m}$. Diámetros comparables fueron determinados por Alvarado (83), quien confrontó el diámetro de ovocitos recolectados de ovarios de camal y los obtenidos por OPU en vacas criollas y obtuvo medidas de $127,2 \pm 0,6$ y $122,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$ respectivamente.

Asimismo, estos hallazgos concuerdan con lo observado por Mocha & Quezada (84), quienes describieron un diámetro promedio de ovocitos antes de la maduración de $124,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$, y observaron que el diámetro de los ovocitos luego de la maduración disminuyó de $124,1$ a $121,1 \mu\text{m}$ ($3 \mu\text{m}$), lo cual tiene similitud con los hallazgos encontrados en este estudio (**Tabla 7**); además, mantienen la tendencia de disminución del diámetro ovocitario indicado por Suzuki *et al.*, (85), quienes investigaron las alteraciones del ovocito bovino pre y pos maduración en la fertilización in vitro. Ellos obtuvieron una media de $99 \mu\text{m}$ antes de la maduración que se redujo a $80 \mu\text{m}$ después de la misma. Y es ratificado por Alvarado *et al.*, (83), quien argumenta que hay una reducción marcada pos maduración del diámetro del ovocito, aunque sus valores son mayores.

Tabla 7: Media y error estándar del diámetro pre y post maduración de los ovocitos aptos y no aptos en los tres grupos de folículos en estudio.

Tipos de COC's	Categoría de folículos		
	G1 (<4mm)	G2 (4-8mm)	G3 (>8mm)
Aptos			
Pre maduración (μm)	121,1 \pm 0,41 ^a	121,9 \pm 0,42 ^{ab}	124,0 \pm 1,13 ^b
Post maduración (μm)	117,7 \pm 0,43 ^a	120,1 \pm 0,52 ^b	120,3 \pm 0,94 ^b
Diferencia (μm)	-3,4 \pm 0,62 ^a	-1,9 \pm 0,69 ^b	-3,7 \pm 1,20 ^a
No aptos			
Pre maduración (μm)	123,3 \pm 0,41 ^a	120,7 \pm 1,16 ^a	122,1 \pm 1,76 ^a
Post maduración (μm)	115,9 \pm 0,43 ^a	120,1 \pm 0,52 ^b	120,3 \pm 0,94 ^b
Diferencia (μm)	-7,3 \pm 0,74 ^a	0,6 \pm 1,38 ^b	0,2 \pm 1,95 ^b

Valores con letras diferentes en la misma línea difieren ^{a,b} P<0,05

4.4 Diámetros de ovocitos no aptos pre y pos maduración

Los grupos 1, 2 y 3 no presentan diferencia en el diámetro del ovocito pre maduración (123,3 \pm 0,41; 120,7 \pm 1,16; 122,1 \pm 1,76 μm respectivamente); sin embargo, el promedio del diámetro de los ovocitos del grupo 1 en no aptos fue superior (123,3 \pm 0,41 μm) a los clasificados como aptos (121,1 \pm 0,41 μm); lo contrario sucedió con los grupos 2 y 3 tal como se aprecia en la **Tabla 7**. Esto conlleva a concluir que el patrón de disminución observado pos maduración en los ovocitos clasificados como aptos se mantuvo únicamente en el grupo 1 (-7,3 \pm 0,74 μm), en los grupos 2 y 3 no se produce esta disminución (0,6 \pm 1,38 μm ; 0,2 \pm 1,95 μm respectivamente), **Tabla 7**

Mattson & Albertini (86), describieron que casi el 90% de los ovocitos aislados de folículos antrales tempranos (0.5 a 2 mm de diámetro), correspondientes al grupo 1 de la presente investigación, tienen una configuración de vesícula germinal cero (GV0), mientras que los folículos antrales medios (2-8 mm) prácticamente no contienen ovocitos GV0, pero si las etapas de vesícula germinal tipo1 (GV1), tipo 2 (GV2) y tipo 3 (GV3) que se presentan en iguales



proporciones (los del grupo 2 de este trabajo). Estos son los folículos más comúnmente utilizados para obtener embriones in vitro (FIV).

Por lo tanto, se puede inferir que los folículos <4 mm (grupo 1) proporcionan ovocitos mayormente inmaduros, es decir, en etapa de GV0, por lo cual al ponerlos a madurar in vitro estos cumplen con el patrón de comportamiento en cuanto a la reducción del diámetro del citoplasma; pero los del grupo 2 (4-8 mm) y 3 (>8 mm) no lo cumplen al provenir de folículos más grandes pueden estar en proceso de atresia trayendo consigo apoptosis ovocitaria según Manabe *et al.*, (87) o maduros los cuales ya cumplieron con el proceso de maduración descrito por Dieci *et al.*, (88) quienes observaron que la maduración puede ser beneficiosa para la competencia de los ovocitos GV1 (ovocitos provenientes de folículos pequeños), pero perjudicial para la de los GV3 (ovocitos provenientes de folículos grandes). Sin embargo, Blondin & Sirard (89), indicaron que la aspiración genera que la mayoría de los ovocitos provenientes de folículos atrésicos, iniciales y tardíos se recuperan y pueden llegar a producir más embriones, en mayor cantidad en los iniciales que en los tardíos, en cuyo caso la cobertura de las células del cúmulo a menudo se pierde parcialmente por el efecto mecánico de la aspiración.

5 Conclusiones

- El tamaño del folículo influyó sobre la tasa de recuperación de ovocitos colectados de ovarios de matadero, obteniéndose mayor porcentaje en aquellos aspirados de folículos entre 4 y 8 mm (grupo 2)
- Además, este grupo de folículos (4-8 mm) proporcionó dos veces más ovocitos aptos que los no aptos del mismo grupo. Asimismo, de los ovocitos clasificados como aptos, 59% fueron BCB+, es decir habían terminado su crecimiento y estaban listos para iniciar el proceso de maduración.
- Los ovocitos aptos del grupo 1 (<4 mm) y 2 (4-8 mm) proveyeron mayor número de ovocitos que lograron reiniciar la meiosis y cumplir con el proceso de maduración nuclear, en comparación con los del grupo 3 (>8 mm). Sin embargo, alrededor del 60% de los ovocitos clasificados como no aptos del grupo 1 (<4 mm) también completaron el proceso de maduración; por lo que pudieran considerarse una fuente interesante de gametas para la PIV.
- Finalmente, se encontró que los ovocitos aptos de los tres grupos foliculares en estudio redujeron su diámetro luego de la MIV; lo cual no ocurrió en los ovocitos no aptos, donde únicamente los del grupo 1 (<4mm) cumplieron con ese patrón de comportamiento.

6 Bibliografía

1. Peláez V. Producción in-vitro de embriones bovinos. Universidad Estatal de Cuenca; 2011. p 80
2. Martínez Y. Análisis de la morfología ovocitaria en Bovina previa a fecundación in vitro. Universidad de Oviedo; 2013. p 36
3. Herradón P, Quintela L, Becerra J, Ruibal S, Fernández M. Fecundación in vitro: Alternativa para la mejor genética en bovinos. Arch Latinoam Prod Anim. 2007;15(1):34–41.
4. Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. In: Reproduction in Domestic Animals. 2003;38(4):259–267.
5. Samaniego J, Ayala L, Nieto P, Rodas E, Vázquez J, Murillo Y. Competencia del ovocito bovino obtenido por ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de cresilo. Maskana Prod Anim. 2017;8(2):77–80.
6. Hansen PJ. Realizing the promise of IVF in cattle - An overview. Vol. 65, Theriogenology. 2006;65(1):119–125.
7. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos 2nd edition. CAB International University Press. 2003. p 325-329
8. Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. Mol Reprod Dev. 2002;61(2):234–248.
9. Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. Mol Reprod Dev. 1995;42(4):437–442.
10. Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P. Effect of

- follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*. 2002;57(5):1523–1532.
11. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. In: *Theriogenology*. 1997;47(1):23–32.
 12. Hendriksen PJM, Vos PLAM, Steenweg WNM, Bevers MM, Dieleman SJ. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. In: *Theriogenology*. 2000;53(1):11–20.
 13. Tan S, Lu K. Effects of different oestrous stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos in vitro. *Theriogenology*. 1990;33(1):335.
 14. Pavlok A, Lucas- Hahn A, Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev*. 1992;31(1):63–67.
 15. Sadler TW. Langman's Essential Medical Embryology. 12th ed. Langmans Essential Medical Embryology. Phyladelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2014. p 150
 16. Palma G. Biotecnología de la reproducción. 1st ed. EEA Balcarse, editor. Buenos Aires; 2001. p 693
 17. Van Den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Vol. 63, *Theriogenology*. 2005;63(6):1717–1751.
 18. Gigli I, Russo A, Agüero A. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet*. 2006;8(1):183–204.
 19. Männikkö M, Törmälä R, Tuuri T, Haltia A, Martikainen H, Ala-Kokko L, et al. Association between sequence variations in genes encoding human zona pellucida glycoproteins and fertilization failure in IVF. *Hum Reprod*. 2005;20(6):1578–1585.



20. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod.* 1986;1(2):81–87.
21. Zhao J, A.M MT, C, Gijsbert van der Weijden MMB, Hurk R van den. Effect of Activin A on In Vitro Development of Rat Preantral Follicles and Localization of Activin A and Activin Receptor II. *Biol Reprod.* 2001;65(3):967–977.
22. Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long- term culture in vitro. *Biol Reprod.* 2000;62(5):1322–1328.
23. Silva JR V, Van den Hurk R, Van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR. Gene expression and protein localisation for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *J Endocrinol.* 2004;183(2):405–415.
24. Nogueira MFG, Buratini J, Price CA, Castilho ACS, Pinto MGL, Barros CM. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: Changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2007;74(6):680–686.
25. Seneda M, Da Silva C, Constantino M, Garbelini R, Aires L, Fortes J. Foliculogénesis en bovinos. *In vitro Brasil.* 2015;3(2):220–310.
26. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil.* 1992;94(1):177–188.
27. Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle: Establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. *Theriogenology.* 1999;52(6):1079–93.
28. Hsueh AJW, Billig H, Tsafiriri A. Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process. *Endocr Rev.* 1994;15(6):707–724.
29. Monniaux D, Mariana JC, Gibson WR. Action of PMSG on follicular populations in the heifer. *J Reprod Fertil.* 1984;70(1):243–253.



30. Kruip TAM, Boni R, Wurth YA, Roelofsen MWM, Pieterse MC. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*. 1994;42(4):675–684.
31. Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, et al. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*. 1995;43(1):141– 152.
32. Perry G. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. In: *Embryo Transfer Newsletter*. 2014;32(4):14–26.
33. De los Reyes M. Fecundación In Vitro: Una nueva reproducción. *TecnoVet*. 1995;1(2):1–2.
34. Del Campo M, Del Campo C, Adams G, Mapletoft R. The application of new reproductive technologies to South American camelids. *Theriogenology*. 1995;43(1):21–30.
35. Kruip AM, Dieleman SJ. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod Nutr Dev*. 1982;22(3):465–473.
36. Filipiak Y, Larocca C. *Manual de fertilización in vitro en bovinos*. 1st ed. Montevideo-Uruguay; 2010. p 1-26
37. Gómez O., Alva G, D S, Huilcas FV. Slicing and follicular aspiration techniques in the recuperation oocytes efficece of creole bovine postmorten in the slaughterhouse. *Spermova*. 2002;2(1):38–39.
38. Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Oliveira JA de, Vantini R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim Reprod Sci*. 2001;67(1–2):37–43.
39. Lonergan P, Vergos E, Kinis A, Sharif H, Gallagher M, Gordon I. The effect of recovery methodo the type of bovine oocytes obtained for IVM. *Theriogenology*. 1991;35(3):231.



40. Hamano S, Kuwayama M. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*. 1993;39(3):703–712.
41. Hashimoto S, Takakura R, Kishi M, Sudo T, Minami N, Yamada M. Ultrasound-guided follicle aspiration: The collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. *Theriogenology*. 1999;51(4):757–765.
42. Kruip TA., Boni R, Roelofsen MW., Wurth YA, Pieterse. M. Application of OPU for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*. 1993;39(2):251.
43. Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci*. 1979;48(1):76–86.
44. De Loos F, Van Maurik P, Van Beneden T, Kruip T a. Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. *Mol Reprod Dev*. 1992;31(3):208–214.
45. Lorenzo P. Maduración in vitro de oocitos de ganado vacuno. Universidad Complutense de Madrid; 1992.
46. Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote*. 2006;14(1):53–61.
47. Mohamed El-Raey, Takashi N. Different Aspects of Cattle Oocyte in vitro Maturation. *Reproduction Infertil*. 2014;5(1):1–13.
48. Anchordoquy J, Sirini M, Picco S, Errecalde A, Furnus C. Importancia del manganeso en la producción in vitro de embriones: rol de las células del cumulus. *Rev Cient Ciencias Médicas*. 2013;4(2):1–6.
49. Sirard MA, First NL. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol Reprod*. 1988;39(2):229–234.



50. Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD, First NL. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol Reprod.* 1983;28(3):717–725.
51. Sirard MA, Coenen K, Bilodeau S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology.* 1992;37(1):39–57.
52. Hawk HW, Wall RJ. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology.* 1994;41(8):1571–1583.
53. Lin Y-H, Hwang J-L. In vitro maturation of human oocytes. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2006;45(2):95–99.
54. Liu S, Li Y, Feng HL, Yan JH, Li M, Ma SY, et al. Dynamic modulation of cytoskeleton during in vitro maturation in human oocytes. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203(2):151–157.
55. Martínez E, Ruiz S, Roca J, Vazquez J. Fecundación in vitro en los animales de granja. 3rd ed. Murcia: Ingramur. SL; 1989.
56. Lorenzo PL, Rebollar PG, Illera MJ, Illera JC, Illera M, Alvariño JM. Stimulatory effect of insulin-like growth factor I and epidermal growth factor on the maturation of rabbit oocytes in vitro. *J Reprod Fertil.* 1996;107(1):109–117.
57. Lechniak D, Świtoński M, Sosnowski M. The incidence of bovine diploid oocytes matured in vitro. *Theriogenology.* 1996;46(2):267–277.
58. Jedlicki A, Barros C. Scanning electron microscope study of in vitro penetration garrete interactions. *Molecular Reprod Dev.* 1985;11(2):121–131.
59. Benjamin B, Gene Ol. Capacitation of Rabbit Spermatozoa in vitro. *Biol Reprod.* 1975;12(1):260–274.



60. Hernández H. Fecundación in vitro. In: Manual de Ganadería. Maracaibo; 2004. p. 615–619.
61. Liu Z, Foote RH. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. Biol Reprod. 1995;53(4):786–790.
62. Crespo J. Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano utilizando el protocolo de Genes Diffusion. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano; 2015. p 35
63. Catala MG, Izquierdo D, Uzbekova S, Morato R, Roura M, Romaguera R, et al. Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. Reproduction. 2011;142(4):517–527.
64. Pujol M, López-Béjar M, Paramio MT. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. Theriogenology. 2004;61(4):735–744.
65. Samaniego J. Evaluación de ovocitos recuperados por Ovum Pick Up (OPU) en tiempos diferentes, luego de la estimulación ovárica con FSH-LH (Pluset®) en vaquillas Criollas. Universidad de Cuenca; 2017. p 82
66. Rodríguez-González E, López-Bejar M, Izquierdo D, Paramio M-T. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. Reprod Nutr Dev. 2003;43(2):179–187.
67. Alm H, Torner H, Löhrke B, Viergutz T, Ghoneim IM, Kanitz W. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. Theriogenology. 2005;63(8):2194–2205.
68. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear



- transfer from a cultured cell line. Vol. 380, Nature. 1996;380(6569):64–66.
69. Barnes FL, Collas P, Powell R, King WA, Westhusin M, Shepherd D. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol Reprod Dev.* 1993;36(1):33–41.
 70. Irquis. CG. Carlos Estrella. “Google Earth.” 2016. p. 10-03–2017.
 71. Perea F, Quezada A, Mocha A, Argudo G, Ayala L, Mendez S, et al. Efecto de la presión de vacío sobre las características funcionales de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero. *Maskana Prod Anim.* 2017;8(2):69–71.
 72. Yang Z, Nielsen R, Hasegawa M. Models of amino acid substitution and applications to mitochondrial protein evolution. *Mol Biol Evol.* 1998;15(12):1600–1611.
 73. Crozet N, Motlik J, Szollosi D. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in porcine oocytes during the early stages of antrum formation. *Biol Cell.* 1981;41:35–42.
 74. Segura G., Cortez J, Cayo S. Capacidad de maduración in-vitro de ovocitos obtenidos de folículos de tres tamaños en bovinos. *Spermova.* 2015;5(1):106–109.
 75. Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1994;37(1):48–53.
 76. Karami S, Gholami M, Qanbari M, Sahafi M. Investigating relation between organizational culture and knowledge management in educational department general of Golestan. In: First national conference of training and psychology Marvdasht (Iran). 2014. p 146
 77. Mirshamsi SM, Karami Shabankareh H, Ahmadi-Hamedani M, Soltani L,

- Hajarian H, Abdolmohammadi AR. Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. *Anim Reprod Sci.* 2013;136(4):245–251.
78. Driancourt MA. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology.* 1991;35(1):55–79.
79. Sirard M, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology.* 2006;7(65):126–136.
80. Gordon I, Lu KH. Production of embryos in vitro and its-impact on livestock production. *Theriogenology.* 1990;33(1):77–87.
81. Arlotto T, Schwartz J-L, First NL, Leibfried-Rutledge ML. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology.* 1996;45(5):943–956.
82. De Wit AAC, Kruip TAM. Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for α -amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity. *Anim Reprod Sci.* 2001;65(1–2):51–65.
83. Alvarado J. Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vacas criollas y ovarios de matadero. Universidad Estatal de Cuenca; 2017. p 69
84. Mocha A, Quezada A. Evaluación de la calidad y maduración de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero con tres presiones de vacío. Universidad Estatal de Cuenca; 2017. p 77
85. Suzuki H, Yang X, Foote RH. Surface alterations of the bovine oocyte and its investments during and after maturation and fertilization in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1994;38(4):421–430.
86. Mattson BA, Albertini DF. Oogenesis: Chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol Reprod Dev.* 1990;25(4):374–383.
87. Manabe N, Goto Y, Matsuda-Minehata F, Inoue N, Maeda A, Sakamaki K,



- et al. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *J Reprod Dev.* 2004;50(5):493–514.
88. Dieci C, Labrecque R, Lodde V., Tessaro I, Luciano AM, Sirard MA. Chromatin remodelling and histone m RNA accumulation in bovine germinal vesicle oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2015;82(6):450–62.
89. Blondin P, Sirard M -A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 1995;41(1):54–62.

7 Anexos

Anexo 1: Operacionalización de las variables

Variable	Dimensiones	Indicador	Escala
Cantidad de folículos por grupo	Valoración mediante una regla del tamaño del folículo y en base a esto determinar el número de los folículos presentes en cada ovario por grupo en estudio	Número de folículos por grupo: Grupo 1: < 4 mm Grupo 2: 4 - 8 mm Grupo 3: > 8 mm	Número
Cantidad de ovocitos Recuperados por aspiración por grupo	Cantidad de ovocitos aspirados, comparados con el número de folículos visualizados, transformado a porcentaje	Número de COCs por grupo Grupo 1: < 4 mm Grupo 2: 4 - 8 mm Grupo 3: > 8 mm	Porcentaje
Calidad de Ovocitos	Valoración de la calidad de los COC's y su clasificación en aptos y no aptos	Cantidad de capas de células del Cúmulo y aspecto del citoplasma	A: Buena (aptos) B: Intermedia (aptos) C: Mala (no aptos)
Morfometría de los Ovocitos (pre y pos maduros)	Determinación del diámetro del citoplasma del ovocito antes del proceso de maduración y luego del mismo	Diámetro, del ovocito expresado en micras.	Diámetro=um
Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (BCB)	Identificar ovocitos que han terminado su crecimiento y están listos para continuar con la maduración	Coloración del citoplasma con BCB	Positivo: ovocito teñido (azul) Negativo: ovocito no teñido
Número de ovocitos que reiniciaron la meiosis	Valoración del reinicio de la meiosis mediante la observación del núcleo en metafase II y la presencia del 1er corpúsculo polar	Encuentren en metafase II y tiene corpúsculo polar	Porcentaje

Anexo 2: Hoja de control de datos



Fecha:

Hora (promedio) de recolección de ovarios:

Hora de inicio de aspiración:

Hora de inicio de maduración:

Aspiración:

Búsqueda:

HOJA DE REGISTRO DE DATOS													
Número de ovarios	Tamaños de folículos												
	<4 mm		4-8 mm		>8 mm								
Total de folículos aspirados													
Total de ovocitos AB													
Total de ovocitos C													
Total ovocitos													
Datos Pre maduración													
Número de ovocitos	AB		C		AB		C		AB		C		
Ovocitos teñidos con azul brillante de cresilo (50%)													
Resultados: positivo (P),negativo(N)	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	
Número													
Morfometría													
Datos Post maduración													
Ovocitos teñidos Hoechst (50%)													
Resultados: positivo (V) ,negativo (NV)	V	NV	V	NV	V	NV	V	NV	V	NV	V	NV	
Número													
Morfometría													

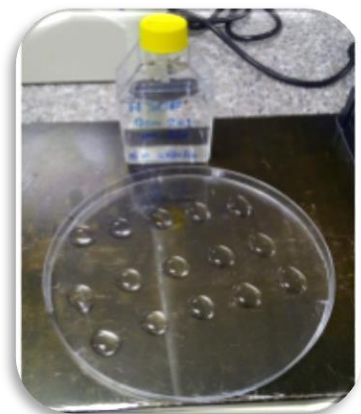
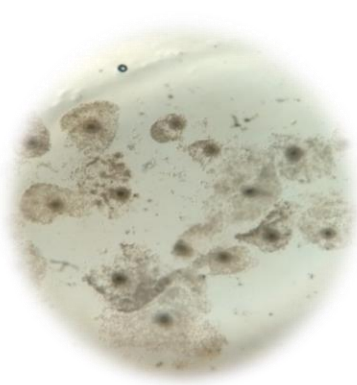
Anexo 3: recolección de ovarios del camal



Anexo 4: Regulación de la presión y aspiración de folículos



Anexo 5: Búsqueda y lavado de los ovocitos



Anexo 7: Ovocitos maduros

